

DIALOG(R)File 352:Derwent WPI  
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

009773400

WPI Acc No: 1994-053251/199407

XRAM Acc No: C94-023754

Novel E.coli transformant containing myoinositol dehydrogenase gene - for  
production and engineering of myoinositol dehydrogenase

Patent Assignee: ASahi CHEM IND CO LTD (ASAH )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 6007158	A	19940118	JP 92164548	A	19920623	199407 B
JP 3251976	B2	20020128	JP 92164548	A	19920623	200214

Priority Applications (No Type Date): JP 92164548 A 19920623

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 6007158	A	13	C12N-001/21	
JP 3251976	B2	14	C12N-001/21	Previous Publ. patent JP 6007158

Abstract (Basic): JP 6007158 A

E. coli transformant containing the recombinant plasmid which has  
the nucleotide sequence encoding the amino acid sequence given in the  
specification, is new.

Also claimed are (1) the pure DNA expressing myoinositol  
dehydrogenase having the amino acid sequence as above; (2) the DNA of  
(1) having the nucleotide sequence as above; (3) the prepn. method of  
myoinositol dehydrogenase obtained by the culture of the above  
microorganism.

USE/ADVANTAGE - Myoinositol dehydrogenase may be obtained easily.  
The protein engineering (change of substrate or specificity of  
coenzyme, or increase of heat resistance) of myoinositol dehydrogenase  
can be done because the nucleotide sequence of myoinositol  
dehydrogenase is determined.

Dwg.0/6

Title Terms: NOVEL; COLI; TRANSFORM; CONTAIN; INOSITOL; DEHYDROGENASE; GENE  
; PRODUCE; ENGINEERING; INOSITOL; DEHYDROGENASE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-001/21

International Patent Class (Additional): C12N-009/04; C12N-015/09;  
C12N-015/53; C12N-001/21; C12R-001-19

File Segment: CPI

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3251976号

(P3251976)

(45) 発行日 平成14年1月28日 (2002. 1. 28)

(24) 登録日 平成13年11月16日 (2001. 11. 16)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup> 識別記号

C 1 2 N 1/21

9/04

15/09

Z N A

// (C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1: 19)

F I

C 1 2 N 1/21

9/04

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1: 19)

(C 1 2 N 9/04

請求項の数 6 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平4-164548

(22) 出願日 平成4年6月23日 (1992. 6. 23)

(65) 公開番号 特開平6-7158

(43) 公開日 平成6年1月18日 (1994. 1. 18)

審査請求日 平成11年4月9日 (1999. 4. 9)

(73) 特許権者 000000033

旭化成株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

(72) 発明者 炭谷 順一

静岡県田方郡大仁町三福632番地の1

旭化成工業株式会社内

(72) 発明者 高橋 守

静岡県田方郡大仁町三福632番地の1

旭化成工業株式会社内

(72) 発明者 今村 茂行

静岡県田方郡大仁町三福632番地の1

旭化成工業株式会社内

審査官 本間 夏子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを生産する実質上純粋な微生物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する組換えプラスミドによって形質転換されたエッシェリヒア・コリーに属する微生物であることを特徴とするミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを生産する実質上純粋な微生物。

【請求項2】 形質転換されたエッシェリヒア・コリーに属する微生物がエッシェリヒア・コリーDH1-pMIDH3 (FERM P-13014) である請求項1記載の微生物。

【請求項3】 配列番号1のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有することを特徴とするミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを発現する実質上純粋なDNA。

【請求項4】 配列番号1のアミノ酸配列をコードする塩基配列が配列番号1の塩基配列の47から1048ま

でである請求項3記載のDNA。

【請求項5】 配列番号1のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する組換えプラスミドによって形質転換された微生物であるミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを生産する実質上純粋な微生物を培地に培養し、次いでその培養物からミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを採取することを特徴とするミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項6】 形質転換された微生物がエッシェリヒア・コリーDH1-pMIDH3 (FERM P-13014) である請求項5記載のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの製造方法。

【発明の詳細な説明】

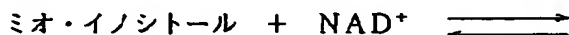
【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はミオ・イノシトールデヒ

1

ドロゲナーゼを生産する実質上純粋な微生物、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを発見する実質上純粋なDNA及びミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの製造法に関するものである。

【0002】



【0004】(式中のNAD<sup>+</sup>及びNADHは、それぞれNADの酸化型及び還元型である)で示されるように、ミオ・イノシトールをミオ・イノソースに変換する触媒作用を有し、酵素番号E. C. 1. 1. 1. 18として知られている(酵素ハンドブック、第6頁、1982年、朝倉書店発行)。ミオ・イノシトールはイノシトールの9つの異性体のうちの1つで、極めて安定した環状アルコールである。人の場合、ミオ・イノシトールは食事によって1日約1g、腎臓における生合成によって1日約2g、計約3gが供給され、細胞への取り込みと腎臓における排せつ・再吸収及び酸化によって血しょうレベルがほぼ一定になるように調節されている。そのため腎機能障害において血しょうミオ・イノシトールレベルの著名な増加が見られる(臨床化学24巻、11号、1448-1455頁、嘉門信雄)。このようにミオ・イノシトールを測定することによって腎機能のモニタリングができることから、ミオ・イノシトールの定量に、前記のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの触媒作用を利用して、この酵素を用いることが示されている(特願平2-249776号公報)。

【0005】このミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼは牛の脳[Biochem. Biophys. Res. Commun., 68, 1133-1138(1976)]や、バチルス(*Bacillus*)属[特開平4-126075号公報、J. Biol. Chem., 254, 7684-7690(1979)]、アエロバクター(*Aerobacter*)属[Methods in Enzymology, 36, 326(1962)[V]]、クレブジエラ(*Klebsiella*)属[酵素ハンドブック、第6頁、1982年、朝倉書店発行]、セラチア(*Serratia*)属[酵素ハンドブック、第6頁、1982年、朝倉書店発行]やクリプトコッカス(*Cryptococcus*)属[Biochem. Biophys. Acta, 293, 295-303(1973)]などに属する微生物に存在することが知られている。種々のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの中でも、特にバチルス・エスピーNo. 3の生産する酵素は反応性、安定性が共に高く、ミオ・イノシトールの測定に有効であることが知られている(特開平4-126075号公報)。

【0006】この中で、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)由来のミオ・イノシト

2

【従来の技術】従来、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼは、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)の存在下、反応式

【0003】

【化1】

ールデヒドロゲナーゼについては遺伝子が既に単離され、遺伝子の塩基配列が決定され、アミノ酸配列が推定されている[Gene, 108, 121-125(1991)]。我々はこの塩基配列及びアミノ酸配列を参考に種々のプローブを作製し、バチルス・エスピーNo. 3のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を取得しようと試みたが、取得できなかった。即ち、後記するように本発明のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列及び該酵素のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列は、バチルス・ズブチリス由来のものとは相同性が低く、各生産菌によってミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼがどのようなアミノ酸配列であるか全く推定できないものであった。

【0007】また、バチルス・ズブチリス由来のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼはミオ・イノシトールに対するKm値が18mMであるのに対し、バチルス・エスピーNo. 3のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼはミオ・イノシトールに対するKm値が0.64mMと反応性が非常に高く、かつ65℃、15分の熱処理で95%以上の残存活性を有する安定性にも優れた酵素である。

【0008】このような状況下、反応性、安定性が共に高く、ミオ・イノシトールの測定に有効であるバチルス・エスピーNo. 3のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼにおいては生産性が低いことから、効率よくこの酵素を生産する微生物の開発が望まれていた。また、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを構成するポリペプチドの一次構造及び該酵素のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列については未だ発表されていない。

【0009】従って、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを構成するポリペプチドの一次構造の決定、該酵素のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列の決定及び遺伝子工学による該酵素の生産が望まれていた。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、このような実情のもとで、ミオ・イノシトールの定量に有用なミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを効率よく生産する微生物を開発し、この微生物を用いて該酵素を量産する方法を提供することを目的としてなされたものである。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは前記目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、ミオ・イノシト

3

ールデヒドロゲナーゼを生産する微生物由来の染色体DNAライブラリーの中から、該酵素を発現する遺伝子DNAをスクリーニングし、次いでこのDNAを用いて発現ベクターを構築したのち、例えばエッシャーヒア・コリー (*Escherichia coli*; 以下 *E. coli* と略称する) に属する微生物に導入して形質転換微生物を作出し、これを培地中で培養することによって、該ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを効率よく量産することを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【0012】すなわち、本発明は、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを発現するDNAを有する組換えプラスミドによって形質転換された *E. coli* に属する微生物であることを特徴とするミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを生産する実質上純粋な微生物、図1で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有することを特徴とするミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを発現する実質上純粋なDNA、及び前記の形質転換された微生物であるミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを生産する実質上純粋な微生物を培地に培養し、次いでその培養物からミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを採取することを特徴とするミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの製造法を提供するものである。

【0013】以下、本発明を詳細に説明する。本発明において、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを生産する形質転換された微生物を作出するのに用いられるミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを発現する遺伝子DNAは、例えば該酵素を生産する微生物由来の染色体DNAライブラリーの中から、スクリーニングすることによって得ることができる。

【0014】本発明においては、前記のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを生産する微生物として、バチルス・エスピーNo. 3が好ましく用いられる。本菌株を利用する場合には、該菌株の菌学的性状、培養手段および精製手段については特開平4-126075号公報の記載を参考とすればよい。このバチルス・エスピーNo. 3の染色体DNAライブラリーから該酵素を発現する遺伝子DNAをスクリーニングする方法の具体例について説明すると、まず、該微生物の染色体DNA100~2000 $\mu$ g程度を通常用いられている方法によって抽出したのち、その1~10 $\mu$ g程度を制限酵素HindIIIで切断して、例えばクローニング用ベクターのプラスミドpUC119HindIII部位に連結し、次いでこの組換えDNAを宿主微生物に導入して該染色体DNAのクローニングを行い、10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup> クローンからなる染色体DNAライブラリーを作製する。この際用いられる宿主微生物としては、組換えDNAが安定でかつ自律的に増殖可能であるものであれば特に制限されず、通常の遺伝子組換えに用いられているもの、例えばエッシャーヒア属、バチルス属に属する微生物などが

4

好ましく使用される。

【0015】宿主微生物に組換えDNAを導入する方法としては、例えば宿主微生物がエッシャーヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下に組換えDNAの導入を行ってもよいし、コンピテントセル法を用いてもよく、またバチルス属に属する微生物の場合には、コンピテントセル法またはプロトプラスト法などを用いることができるし、エレクトロポレーション法あるいはマイクロインジェクション法を用いてもよい。宿主微生物への所望組換えDNA導入の有無の選択については、組換えDNAを構成するベクターの薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で、該宿主微生物を培養し、生育する宿主微生物を選択すればよい。

【0016】一方、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ精製標品のN末端側アミノ酸配列、リシルエンドペプチダーゼ処理断片アミノ酸配列、及びアスパラギンルエンドペプチダーゼ処理断片アミノ酸配列を決定し、これに基づいて種々のオリゴヌクレオチドを合成した後、例えばアイソトープで標識して放射性オリゴヌクレオチドプローブを作製する。

【0017】次いで、これらの放射性オリゴヌクレオチドプローブを用い、従来慣用されている方法に従って、前記の染色体DNAの中から、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを発現する遺伝子をスクリーニングするわけであるが、この段階が本発明において非常に困難な部分であり、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの部分的なアミノ酸配列から種々のプローブを作製したが、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を保持するクローンをなかなか見い出せなかった。具体的に述べるとプローブを設計する場合、一般に推定されるDNA配列の組合せがなるべく少ない配列を選択してプローブを合成するが、本発明のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの場合、組合せの少ない配列が余り存在せず、バチルス・エスピーNo. 3と近縁であると考えられるバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) やバチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) の遺伝子のコドン使用頻度を参考にして数多い組合せの中から組合せを絞ったプローブを作製したり、複数に推定される部分の塩基をイノシンにしたプローブを作製したり、またプローブの長さについても種々検討し、さらにハイブリダイゼーション、及びその後の洗浄の条件(溶液の組成、温度、時間)を種々検討した結果、後の実施例で述べるが、本発明においてはアスパラギンルエンドペプチダーゼ処理断片アミノ酸配列に基づく放射性オリゴヌクレオチドプローブを用い、特定の条件でハイブリダイゼーション、洗浄を行って釣り上げられたものが、目的の遺伝子DNAであることが判明した。

【0018】次に、この目的の遺伝子DNAを含む形質転換された宿主微生物から、例えばマニアティス (Ma

5

niatis)らの方法[「モレキュラ・クローニング: コールドスプリングハーバー (Molecular Cloning: Cold Spring Harbor)」(1982年)]などに従って、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを発現するDNAを含む組換えプラスミド(pMIDH1と命名)を調製することができる。このプラスミドの構成を示す模式図を図4に示す。また、該プラスミド中のパチルス・エスピーNo. 3染色体DNA由来の部位の制限酵素地図は図3に示すとおりである。

【0019】次に、前記のようにして染色体DNAライブラリーの中から、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを発現する遺伝子DNAを組み込んだ発現ベクターを構築する。この発現用ベクターとしては、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージまたはプラスミドから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。前者のファージとしては、例えばE. coliを宿主微生物とする場合には、λgt<sup>+</sup>・λC、λgt<sup>+</sup>・λBなどが用いられる。また、プラスミドとしては、E. coliを宿主微生物とするに、例えばpBR322、pBR325、pACYC184、pUC12、pUC13、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119などが用いられる。さらに、パチルス属を宿主微生物とする場合は、例えばpHY300PLKなどを用いればよく、サッカロミセス属を宿主微生物とする場合は、例えばpYAC5などを用いればよい。

【0020】これらのベクターに、該ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子DNAを組み込む方法については特に制限はなく、従来慣用されている方法を用いることができる。例えば適当な制限酵素を用いて、前記のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子DNAを含む組換えプラスミド及び該発現用ベクターを処理し、それぞれミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含むDNA断片及びベクター断片を得たのち、それぞれの接着末端をアニーリング後、適当なDNAリガーゼを用いて結合させることによって、発現ベクターが得られる。

【0021】後述の実施例における発現ベクターは、前記の組換えプラスミドpMIDH1とベクタープラスミドpUC119から得られ、pMIDH3と命名されたものであり、その構成の模式図は図5に示すとおりである。このようにして、構築された発現ベクターをE. coliに属する微生物に導入し、該宿主微生物を形質転換させればミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを生産する実質上純粋な微生物が得られる。発現ベクターの導入及び選択方法については前述した方法を用いて行う。

【0022】本発明においては、前記組換えプラスミドpMIDH3によって形質転換されたE. coliに属する微生物は、エシェリヒア・コリDH1-pMIDH3 (FERM P-13014)と命名される。この

6

ようにして得られた形質転換微生物の培養は、該微生物の生育に必要な炭素源や窒素源などの栄養源や無機成分などを含む培地中において行うことができる。

【0023】該炭素源としては、例えばグルコース、デンプン、ショ糖、モラッセス、デキストリンなどが、窒素源としては、例えばペプトン、肉エキス、カゼイン加水分解物、コーンステープリカー、硝酸塩、アンモニウム塩などが、無機成分としては、例えばナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、亜鉛、マンガン、鉄などの陽イオンや塩素、硫酸、リン酸などの陰イオンを含む塩が挙げられる。

【0024】培養方法については特に制限はなく公知の方法、例えば通気攪拌培養、振盪培養、回転培養、静置培養などの方法によって、通常20〜50℃、好ましくは25〜42℃、より好ましくは37℃近辺で、12〜48時間程度培養する方法が用いられる。このようにして培養を行ったのち、遠心分離処理などの手段によって菌体を集め、次いで酵素処理、自己消化、フレンチプレス、超音波処理などによって細胞を破壊して目的とする酵素を含有する抽出液を得る。この抽出液から、該酵素を分離、精製するには、例えば、塩析、脱塩、イオン交換樹脂による吸脱着処理などを行ったのち、さらに吸着クロマトグラフィー、ゲル濾過、電気泳動法などによって精製すればよい。

【0025】この精製標品について、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの酵素活性及び物理化学的性質を調べることによって、該形質転換微生物がミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの産生能を有することが確認された。したがって、本発明において用いたミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを発現する遺伝子DNAは、図1で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有し、かつその塩基配列が図2に示す配列であることが明らかである。

【0026】このようにして得られたミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼは、NADの存在下、ミオ・イノシトールをミオ・イノソースに効果的に変換する触媒作用を有することから、例えば血清中のミオ・イノシトール定量などの臨床用酵素として有用である。なお、本発明明細書に記載の塩基配列の記号及びアミノ酸配列の記号は、当該分野における慣用略号に基づくもので、それらの例を以下に列記する。また、すべてのアミノ酸はL体を示すものとする。

【0027】DNA: デオキシリボ核酸

A: アデニン

T: チミン

G: グアニン

C: シトシン

N: アデニン、チミン、グアニンまたはシトシン

R: アデニンまたはグアニン

Y: チミンまたはシトシン

7

Ala: アラニン  
 Arg: アルギニン  
 Asn: アスパラギン  
 Asp: アスパラギン酸  
 Cys: システイン  
 Gln: グルタミン  
 Glu: グルタミン酸  
 His: ヒスチジン  
 Ile: イソロイシン  
 Leu: ロイシン  
 Lys: リジン  
 Met: メチオニン  
 Phe: フェニルアラニン  
 Pro: プロリン  
 Ser: セリン  
 Thr: スレオニン  
 Trp: トリプトファン  
 Tyr: チロシン  
 Val: バリン

## 【0028】

【実施例】次に、参考例及び実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例によってなら限定されるものではない。

## 【0029】

## 【参考例1】 染色体DNAの分離

バチルス・エスピーNo. 3 (FERM BP-3013) 菌株を普通ブイヨン培地 [18g/リットル、普通ブイヨン「栄研」(栄研化学社製)] 200ml にて37℃で一昼夜振盪培養した後、この培養液を高速冷却遠心機 (トミーCX-250型) を用い、6500rpm (7660G) で10分間遠心分離処理して、菌体を集菌した。

【0030】次いで、この菌体を50mM トリスー塩酸 (pH8.0)、50mM EDTA (pH8.0) 及び15%シュクロースからなる溶液20ml 中に懸濁し、最終濃度が2mg/ml となるようにリゾチーム (生化学工業社製) を加え、37℃で30分間処理して菌株の細胞壁を破壊した。次に、これに10%ラウリル硫酸ナトリウム (シグマ社製) 水溶液1ml を加えて、37℃で20分間処理した後、10000rpm (12080G) で10分間遠心分離処理して水相を回収した。この水相に2倍量のエタノールを静かに重層し、ガラス棒でゆっくり攪拌しながら、DNAをガラス棒にまきつけて分離した後、10mM トリスー塩酸 (pH8.0) 及び1mM EDTA からなる溶液20ml で溶解し、次いでこれに等量のフェノール/クロロホルム (1/1) 混合液を加え、前記と同様に処理して水相を分取した。

【0031】次に、この水相に2倍量のエタノールを加えて前記の方法でもう一度DNAを分離した後、10m

8

M トリスー塩酸 (pH8.0) 及び1mM EDTA からなる溶液2ml に溶解した。

## 【0032】

## 【参考例2】 バチルス・エスピーNo. 3 遺伝子ライブラリーの作製

参考例1で得られたバチルス・エスピーNo. 3 染色体5μg 及びクローニングベクターpUC119 (宝酒造社製) 5μg のそれぞれを別の容器中で、制限酵素HindIII (宝酒造社製) 30単位を用い、50mM トリスー酢酸 (pH7.5)、100mM NaCl、10mM MgCl<sub>2</sub> 及び1mM DTT からなる混合物10μg/ml の存在下、37℃で2時間切断処理した。

【0033】pUC119の切断溶液は、5'末端を脱リン酸化するために、さらに反応液にアルカリ性ホスファターゼ (宝酒造社製) 1単位を加えて65℃で2時間処理した。次に、前記のようにして得られた2種のDNA溶液を混合し、この混合液に等量のフェノール/クロロホルム (1/1) 混合液を加えて処理した後、遠心分離処理によって水相を分取した。次いで、この水相に1/10量の3M酢酸ナトリウム溶液を加え、さらに2倍量のエタノールを加えて遠心分離処理することによってDNAを沈澱させた後、減圧乾燥した。

【0034】このDNAを10mM トリスー塩酸 (pH8.0) 及び1mM EDTA 溶液からなる溶液にて溶解した後、66mM トリスー塩酸 (pH7.6)、6.6mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTT 及び660μM ATP (ベーリンガー・マンハイム社製) の存在下、T4 DNAライゲース [宝酒造社製] 100単位を用い、16℃で16時間ライゲーションを行った。

【0035】次に、これをケー・シゲサダ (K. Shigesada) の方法 [「細胞工学」第2巻、616~626ページ (1983年)] によってコンピテント細胞としたE. coli DH1 (ATCC33849)

[F<sup>-</sup>, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r<sup>k</sup>-, m<sup>k</sup>+), SupE44, relA1, λ<sup>-</sup>] [「モレキュラー・クローニング: コールドスプリングハーバー (Molecular Cloning: Cold Spring Harbor)」504~506ページ (1982年)] にトランスフォーメーションし、これをアンピシリン50μg/ml 含有BHI 寒天培地にて、37℃で一昼夜培養し、約8000株の形質転換微生物を得て、バチルス・エスピーNo. 3 遺伝子ライブラリーとした。

## 【0036】

## 【参考例3】 放射性オリゴヌクレオチドプローブの作製

ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ精製標品のN末端側アミノ酸配列、リシルエンドペプチダーゼ処理断片、及びアスパラギンイルエンドペプチダーゼ処理断片のAmi

9

ノ酸配列を調べたところ、図-6に示す配列が決定された。この情報をもとに遺伝子の5'末端側から塩基配列を予想した。この予想された塩基配列には種々の組合せが考えられるので、組合せの数が少ない部分のオリゴヌクレオチドを設計して実験を行った。このオリゴヌクレオチドはアール・エル・レッシンジャーらの方法[「ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ(J. Am. Chem. Soc.)」第98巻、3655ページ]に基づき、DNAシンセサイザー[サイクロン(バイオサーチ社製)]を用いて作製した。

【0037】すなわち、図6の下線の部分のアミノ酸配列GluからAlaに対応するDNAの組合せは20マーのものを考えた場合64通り存在する。したがって、アミノ酸配列から推定されるmRNAに相補的な20マーのオリゴヌクレオチドを作製した。このようにして得られたオリゴヌクレオチド50ngをT4ポリヌクレオチドキナーゼバッファー[50mMトリス塩酸(pH 8.0)、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mM 2-メルカプトエタノール]及び370キロボケレルの[γ-<sup>32</sup>P]ATP(アマシャムジャパン社製)の存在下、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(東洋紡績社製)8.5単位を用い、37℃で30分間反応させて、アイソトープ<sup>32</sup>Pを取り込ませ、放射性オリゴヌクレオチドプローブを作製した。

【0038】

【実施例1】 ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子含有DNAのスクリーニング

参考例2で得たバチルス・エスピーNo. 3遺伝子ライブラリー、すなわち平板寒天培地上のアンピシリン耐性コロニーの上に、ナイロンメンブレンフィルター[ハイボンダー-N+(アマシャムジャパン社製)]を重ね、フィルター上に該コロニー菌体の一部を移行させた後、このフィルターをアルカリ変性溶液(1.5M NaCl含有0.5N-NaOH溶液)中に5分間浸し、さらに中和溶液[0.5Mトリス塩酸(pH 7.0)及び3M NaCl混合液]に5分間浸漬後、乾燥させた。

【0039】次に、このフィルターを80℃で2時間加熱し、菌体中にあったプラスミドDNAをフィルターに固定した。さらに、このフィルターを、1.8M NaCl、0.18Mクエン酸ナトリウム、0.05%ニリン酸ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム、0.1%フィコール、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%BSA及び0.01%サケ精子DNAを含有するプレハイブリダイゼーション溶液に浸し、37℃で一昼夜プレハイブリダイゼーションを行った。その後、フィルターを、1.8M NaCl、0.18Mクエン酸ナトリウム、0.05%ニリン酸ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム、0.1%フィコール、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%BSA及び0.002%大腸菌由来のトランスファーRNAを含有するハイ

10

ブリダイゼーション溶液に浸した後、参考例3で得られた放射性オリゴヌクレオチドプローブを加え、37℃で24時間ハイブリダイゼーションを行った。

【0040】ハイブリダイゼーション後、1.8M NaCl、0.18Mクエン酸ナトリウム、0.05%ニリン酸ナトリウムを含む洗浄液でフィルターを3回洗浄した後、42℃の洗浄液に10分間浸し、余分なプローブを洗い落とした。ついで、フィルターを風乾後、X線フィルム(富士写真フィルム社製、NewRXO-H)に重ね、遮光下-80℃で24時間オートラジオグラフィを行った。

【0041】その後、フィルムを現像したところ、ポジティブシグナルを示すコロニーを確認した。該コロニーをミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼをコードするDNAを含む形質転換体*E. coli* DH1-pMIDH1と命名した。

【0042】

【実施例2】 組み換えプラスミドの抽出

上記実施例1で取得した*E. coli* DH1-pMIDH1を、BHI培地に於て37℃で一昼夜培養した後、ティー・マニアティスらの方法[「モレキュラー・クローニング:コールド・スプリング・ハーバー(Molecular Cloning: Cold Spring Harbor)」第86~94ページ(1982年)]によって、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼをコードするDNAを含む組み換えプラスミドpMIDH1を抽出した。このプラスミドの構成を示す模式図を図4に示す。該プラスミド中のバチルス・エスピーNo. 3染色体由来の部位をジデオキシ法[「サイエンス(Science)」第214巻、第1205~1210ページ(1981年)]により、塩基配列を決定し、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼをコードする全DNAが含まれていることを確認すると共に、その全塩基配列を決定し、少なくとも図2にて示される配列を含むものであることを確認した。

【0043】今回解析したミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼのN末端側アミノ酸配列、リシルエンドペプチダーゼ処理断片アミノ酸配列、及びアスパラギンエンドペプチダーゼ処理断片アミノ酸配列とも同一フレームにおいて完全に一致した。

【0044】

【実施例3】 大腸菌内でのミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの活性発現

実施例2で得られたプラスミドpMIDH1 5μgを制限酵素BamHI(宝酒造社製)で切断し、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含む約2.1kbのDNAフラグメントを1.0%アガロースゲル電気泳動で分離回収した。

【0045】一方、*E. coli*のベクタープラスミドpUC119(宝酒造社製)5μgを前記と同様に切断

11

し、50mMトリス塩酸(pH8.0)存在下に、アルカリ性フォスファターゼ(宝酒造社製)1単位を加え、65℃で2時間処理した。次いで、前記のDNA溶液を混合し、参考例3と同様にライゲーション、トランスフォーメーションを行い、アンピシリン50μg/ml含有BHI寒天培地にまき、37℃で一昼夜培養した。このようにして、ベクタープラスミドpUC119のBamHI部位にミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含む約2.1kbのDNAフラグメントが挿入されたプラスミドpMIDH2を保持する形質転換微生物を取得し、実施例2の方法で組換えプラスミドpMIDH2を得た。

【0046】次に、このプラスミドpMIDH2 5μgを制限酵素XbaI及びPstI(宝酒造社製)で切断し、キローシークエンスディレクションキット(宝酒造社製)を用いてディレクション反応を行い、前記と同様にトランスフォーメーションした。得られた形質転換体数種から実施例2と同様に処理してプラスミドを抽出し、1.0%アガロースゲル電気泳動にて挿入断片が約1.7kbまでディレクションされているプラスミドを確認し、これをプラスミドpMIDH3と命名した。このプラスミドの構成を示す模式図を図5に示す。このプラスミドpMIDH3は、さらに前記と同様の方法によりE.coliDH1に形質転換した。

【0047】プラスミドpMIDH3を保持する形質転換微生物をアンピシリン50μg/ml含有BHI培地にて37℃一昼夜培養した後、培養液を15000rpmで1分間遠心分離処理して沈澱を回収した。この沈澱に、該培養液と同量の10mMトリス塩酸(pH8.0)を加え、超音波破碎を行った。この破碎液を適宜希釈した後、20μlとり、これに1Mトリス塩酸(pH8.5)100μl、150mMミオ・イノシトール100μl、10mM NAD100μl、0.25%ニトロブルーテトラゾリウム100μl、100単位/mlジアフォラーゼ50μl、及び水550μlからなる反応液1000μlを加え、37℃で10分間反応した後、0.1N HClを2ml加えて反応を停止し、550nmにおける吸光度を測定することによって、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ活性を定量した。なお、比較のためにpUC119のみをトランスフォーメーションしたE.coliの破碎液についても前記と同様の処理を行い、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ

12

活性を測定した。その結果、プラスミドpMIDH3を保持した形質転換微生物での活性は2.5U/mlであったが、pUC119を持つものの活性は0U/mlであった。これより、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ活性をもつ形質転換体が得られていることが確認された。この形質転換体をエッシャーヒア・コリーDH1-pMIDH3(*Escherichia coli* DH1-pMIDH3)(FERM P-13014)と命名した。さらに得られたミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを単離・精製し、分子量が130,000±15,000(TSKゲルG3000SWによるゲル濾過法)であることや等電点がpI4.5±0.5であることなど発現蛋白の物理化学的性質を確認し、バチルス・エスピーNo.3のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼと同一であることを確認した。

【0048】

【発明の効果】本発明によるとバチルス・エスピーNo.3由来の染色体DNAライブラリーから、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを発現する遺伝子DNAをスクリーニングし、これを用いて構築された発現ベクターの組み換えプラスミドを例えばE.coliに属する微生物に導入することによって、得られた形質転換微生物は効率よくミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを生産することができる。

【0049】また、本発明によって、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの全アミノ酸配列及びこのアミノ酸をコードする遺伝子DNAの塩基配列が決定できたので、該酵素の基質及び補酵素特異性の変換や耐熱性の向上などのプロテインエンジニアリングが可能となった。

【0050】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1092

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：バチルス・エスピー

株名：No.3

配列の名称：ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子

agcgcttact caaactaatg cttaaaagtg aaggagaag agatgg atg tcg cta 55

Met Ser Leu

1

gtg aaa gtg ggg att tta gga gca ggt gga att gca aaa gtt cac act 103

Val Lys Val Gly Ile Leu Gly Ala Gly Gly Ile Ala Lys Val His Thr

5

10

15

tcc att tta aag aag gac cag cgg gtc gaa atc gtc ggt gtc gca gat 151

Ser Ile Leu Lys Lys Asp Gln Arg Val Glu Ile Val Gly Val Ala Asp



20	25	30	35	
att gcg aaa gac aga gca gtt gct tta gca aat gaa gct ggg aac gct				<u>199</u>
Ile Ala Lys Asp Arg Ala Val Ala Leu Ala Asn Glu Ala Gly Asn Ala				
40	45	50		
aaa gct gtt caa agt tta gaa gat tta ttc gaa ctg gga gtc gat gcc				<u>247</u>
Lys Ala Val Gln Ser Leu Glu Asp Leu Phe Glu Leu Gly Val Asp Ala				
55	60	65		
gta tat gta aca acc cct aat acg ttg cat gtc gaa cct gtg ttg aaa				<u>295</u>
Val Tyr Val Thr Thr Pro Asn Thr Leu His Val Glu Pro Val Leu Lys				
70	75	80		
tgt ctt gca aac aat gtt cat gta ttt tca gaa aaa ccg atg gct acg				<u>343</u>
Cys Leu Ala Asn Asn Val His Val Phe Ser Glu Lys Pro Met Ala Thr				
85	90	95		
tcg tta gaa ggg gct gag cga atc cga aaa gcg gct gaa acg tca aaa				<u>391</u>
Ser Leu Glu Gly Ala Glu Arg Ile Arg Lys Ala Ala Glu Thr Ser Lys				
100	105	110	115	
gcc gta tac aat tta ggg atg aac cgc cgc tat gcg tcc gta tac aaa				<u>439</u>
Ala Val Tyr Asn Leu Gly Met Asn Arg Arg Tyr Ala Ser Val Tyr Lys				
120	125	130		
aaa gtc aaa gaa ctc att tct tct ggt gaa gtc acc cca tat tta gcg				<u>487</u>
Lys Val Lys Glu Leu Ile Ser Ser Gly Glu Val Thr Pro Tyr Leu Ala				
135	140	145		
aat atc aaa atg aac cgc ggc gaa ctg tta aac cct gct tgg aca gct				<u>535</u>
Asn Ile Lys Met Asn Arg Gly Glu Leu Leu Asn Pro Ala Trp Thr Ala				
150	155	160		
gat cca aaa gta aca ggt gga ttc ctt tat gaa acc cct ttc cat cta				<u>583</u>
Asp Pro Lys Val Thr Gly Gly Phe Leu Tyr Glu Thr Pro Phe His Leu				
165	170	175		
atg gat atg tgc cgt tat tta ttt gga gaa gta cag acc gtt tat tgt				<u>631</u>
Met Asp Met Cys Arg Tyr Leu Phe Gly Glu Val Gln Thr Val Tyr Cys				
180	185	190	195	
gaa gga cga caa aat att tct gaa gcg gaa atc gat aca ttt gcg att				<u>679</u>
Glu Gly Arg Gln Asn Ile Ser Glu Ala Glu Ile Asp Thr Phe Ala Ile				
200	205	210		
atg atg aca ttt gaa tca gga acg atc gcc aac ttt gtg act tat gca				<u>727</u>
Met Met Thr Phe Glu Ser Gly Thr Ile Ala Asn Phe Val Thr Tyr Ala				
215	220	225		
cat gct gga tgg agt ttc cct ttt gag agt tta gaa gtt tac gga aaa				<u>775</u>
His Ala Gly Trp Ser Phe Pro Phe Glu Ser Leu Glu Val Tyr Gly Lys				
230	235	240		
tat tgt aca gtt gcc acg caa gaa ctg gaa aaa gtg atg tat gca ccg				<u>823</u>
Tyr Cys Thr Val Ala Thr Gln Glu Leu Glu Lys Val Met Tyr Ala Pro				
245	250	255		
gga tta aag caa cca gct caa att agc gat ttt tat caa tta tct atc				<u>871</u>
Gly Leu Lys Gln Pro Ala Gln Ile Ser Asp Phe Tyr Gln Leu Ser Ile				
260	265	270	275	
gaa gaa aaa tgg gga tat gcg gag gag gat cgc ctc ttt att gac gcc				<u>919</u>
Glu Glu Lys Trp Gly Tyr Ala Glu Glu Asp Arg Leu Phe Ile Asp Ala				
280	285	290		
att att cat gga acg aaa cca cca gtc aca gcg gaa gac gga tat cga				<u>967</u>

Ile Ile His Gly Thr Lys Pro Pro Val Thr Ala Glu Asp Gly Tyr Arg  
 295 300 305  
 tcg att caa ttg tta gag tcc att tat gaa agc gct aaa act ggt aaa 1015  
 Ser Ile Gln Leu Leu Glu Ser Ile Tyr Glu Ser Ala Lys Thr Gly Lys  
 310 315 320  
 atg atc gat ttc cgc caa aca gca cca tca caa taaaacagag taggtgaca 1068  
 Met Ile Asp Phe Arg Gln Thr Ala Pro Ser Gln  
 325 330  
 atatgagcaa aaaacaagtt cgaa 1092

【0051】

【配列表】

配列番号：2

配列の長さ：20塩基対

鎖の数：一本鎖

配列

GCRAANCCCC AYTTYACYAC

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列を示す図である。

【図2】図2は図1のアミノ酸をコードするミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子DNAの塩基配列を示す図である。

【図3】図3はプラスミドpMIDH1におけるパチルス・エスピーNo. 3由来の染色体DNAの制限酵素地図である。

【図4】図4はプラスミドpMIDH1の構造を示す模式図である。

【図5】図5はプラスミドpMIDH3の構造を示す模式図である。

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の名称：ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子プローブPM-7

20

【図6】図6はミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ精製標品のN末端側アミノ酸配列、リシルエンドペプチダーゼ処理断片アミノ酸配列、及びアスパラギンエンドペプチダーゼ処理断片アミノ酸配列を解析し、つなぎ合わせた部分的なミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列を示す図である。なお、Xは不明アミノ酸を示す。

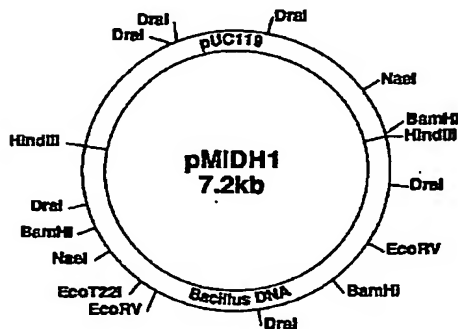
【図7】図7はオリゴヌクレオチドプローブの作製に用いたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す図である。

【図8】図8は本発明で用いたミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子発現ベクターの構築の流れを示す模式図である。

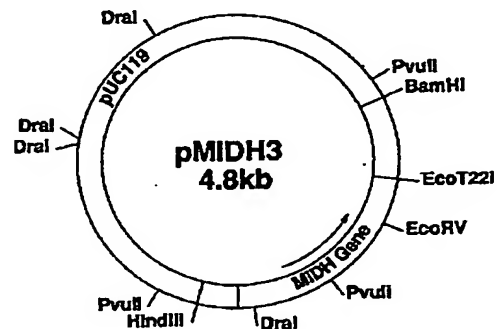
【図9】図9は図8の続きである。

30

【図4】



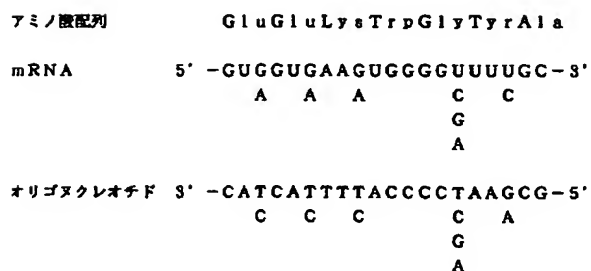
【図5】



【図1】

Met Ser Leu Val Lys Val Gly Ile Leu Gly Ala Gly Gly Ile Ala  
 Lys Val His Thr Ser Ile Leu Lys Lys Asp Gln Arg Val Glu Ile  
 Val Gly Val Ala Asp Ile Ala Lys Asp Arg Ala Val Ala Leu Ala  
 Asn Glu Ala Gly Asn Ala Lys Ala Val Gln Ser Leu Glu Asp Leu  
 Phe Glu Leu Gly Val Asp Ala Val Tyr Val Thr Thr Pro Asn Thr  
 Leu His Val Glu Pro Val Leu Lys Cys Leu Ala Asn Asn Val His  
 Val Phe Ser Glu Lys Pro Met Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala Glu  
 Arg Ile Arg Lys Ala Ala Glu Thr Ser Lys Ala Val Tyr Asn Leu  
 Gly Met Asn Arg Arg Tyr Ala Ser Val Tyr Lys Lys Val Lys Glu  
 Leu Ile Ser Ser Gly Glu Val Thr Pro Tyr Leu Ala Asn Ile Lys  
 Met Asn Arg Gly Glu Leu Leu Asn Pro Ala Trp Thr Ala Asp Pro  
 Lys Val Thr Gly Gly Phe Leu Tyr Glu Thr Pro Phe His Leu Met  
 Asp Met Cys Arg Tyr Leu Phe Gly Glu Val Gln Thr Val Tyr Cys  
 Glu Gly Arg Gln Asn Ile Ser Glu Ala Glu Ile Asp Thr Phe Ala  
 Ile Met Met Thr Phe Glu Ser Gly Thr Ile Ala Asn Phe Val Thr  
 Tyr Ala His Ala Gly Trp Ser Phe Pro Phe Glu Ser Leu Glu Val  
 Tyr Gly Lys Tyr Cys Thr Val Ala Thr Gln Glu Leu Glu Lys Val  
 Met Tyr Ala Pro Gly Leu Lys Gln Pro Ala Gln Ile Ser Asp Phe  
 Tyr Gln Leu Ser Ile Glu Glu Lys Trp Gly Tyr Ala Glu Glu Asp  
 Arg Leu Phe Ile Asp Ala Ile Ile His Gly Thr Lys Pro Pro Val  
 Thr Ala Glu Asp Gly Tyr Arg Ser Ile Gln Leu Leu Glu Ser Ile  
 Tyr Glu Ser Ala Lys Thr Gly Lys Met Ile Asp Phe Arg Gln Thr  
 Ala Pro Ser Gln

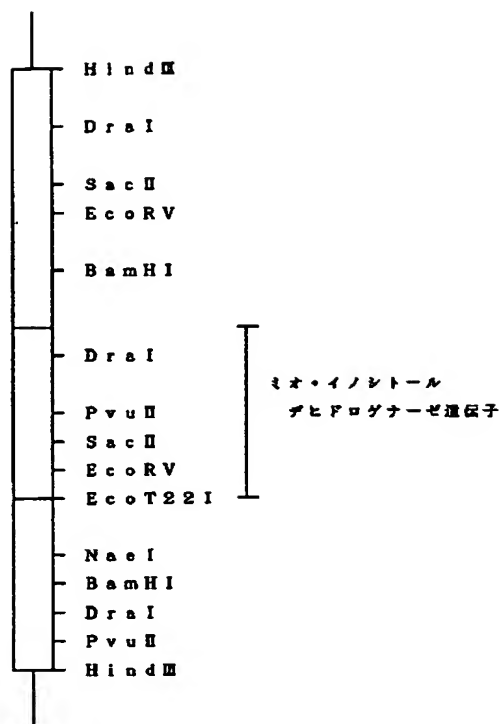
【図7】



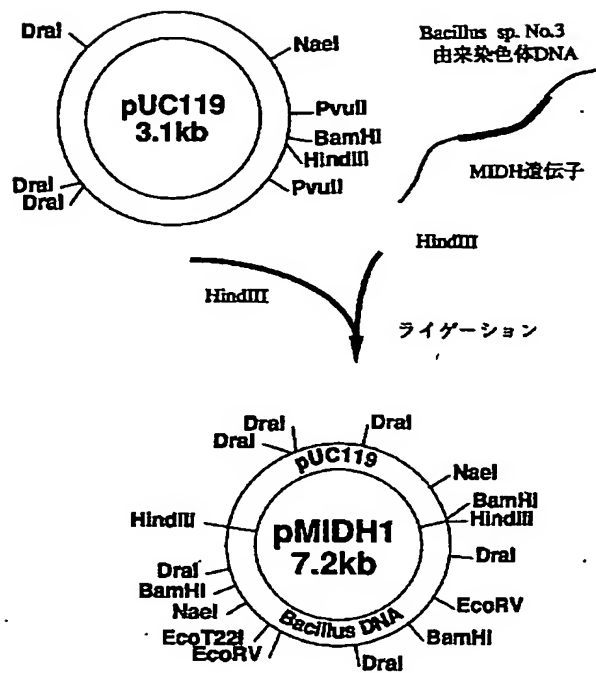
【図 2】

10	20	30	40	50	60
ATGTCGCTAG	TGAAAGTGGG	GATTTTAGGA	GCAGGTGGAA	TTGCAAAAGT	TCACACTTCC
70	80	90	100	110	120
ATTTTAAAGA	AGGACCAGCG	GGTCGAAATC	GTCGGTGTCG	CAGATATTGC	GAAAGACAGA
130	140	150	160	170	180
GCAGTTGCTT	TAGCAAATCA	AGCTGGGAAC	GCTAAAAGCTG	TTCAAAGTTT	AGAAGATTTA
190	200	210	220	230	240
TTCGAACTGG	GAGTCGATGC	CGTATATGTA	ACAACCCCTA	ATACGTTGCA	TGTCGAACCT
250	260	270	280	290	300
GTGTTGAAAT	GTCTTGCAAA	CAATGTTTCAT	GTATTTTCAG	AAAAACCGAT	GGCTACGTCG
310	320	330	340	350	360
TTAGAAGGGG	CTGAGCGAAT	CCGAAAAGCG	GCTGAAACGT	CAAAAGCCGT	ATACAATTTA
370	380	390	400	410	420
GGGATGAACC	GGCGCTATGC	GTCCGTATAC	AAAAAAGTCA	AAGAACTCAT	TTCTTCTGGT
430	440	450	460	470	480
GAAGTCACCC	CATATTTAGC	GAATATCAAA	ATGAACCGCG	GCGAACTGTT	AAACCCTGCT
490	500	510	520	530	540
TGGACAGCTG	ATCCAAAAGT	AACAGGTGGA	TTCCTTTATG	AAACCCCTTT	CCATCTAATG
550	560	570	580	590	600
GATATGTGCC	GTTATTTATT	TGGAGAAGTA	CAGACCGTTT	ATTGTGAAGG	ACGACAAAAT
610	620	630	640	650	660
ATTTCTGAAG	CGGAAATCGA	TACATTTGCG	ATTATGATGA	CATTTGAATC	AGGAACGATC
670	680	690	700	710	720
GCCAACTTTG	TGACTTATGC	ACATGCTGGA	TGGAGTTTCC	CTTTTGAGAG	TTTAGAAGTT
730	740	750	760	770	780
TACGGAAAAT	ATTGTACAGT	TGCCACGCAA	GAAGTGGAAA	AAGTGATGTA	TGCACCGGGA
790	800	810	820	830	840
TTAAAGCAAC	CAGCTCAAAT	TAGCGATTTT	TATCAATTAT	CTATCGAAGA	AAAATGGGGA
850	860	870	880	890	900
TATGCGGAGG	AGGATCGCCT	CTTTATTGAC	GCCATTATTC	ATGGAACGAA	ACCACCAGTC
910	920	930	940	950	960
ACAGCGGAAG	ACGGATATCG	ATCGATTCAA	TTGTTAGAGT	CCATTTATGA	AAGCGCTAAA
970	980	990	1000	1010	1020
ACTGGTAAAA	TGATCGATTT	CCGCCAAACA	GCACCATCAC	AATAAAACAG	AGTAGGTGAC
1030	1040				
AATATGAGCA	AAAAACAAGT	TCGAA			

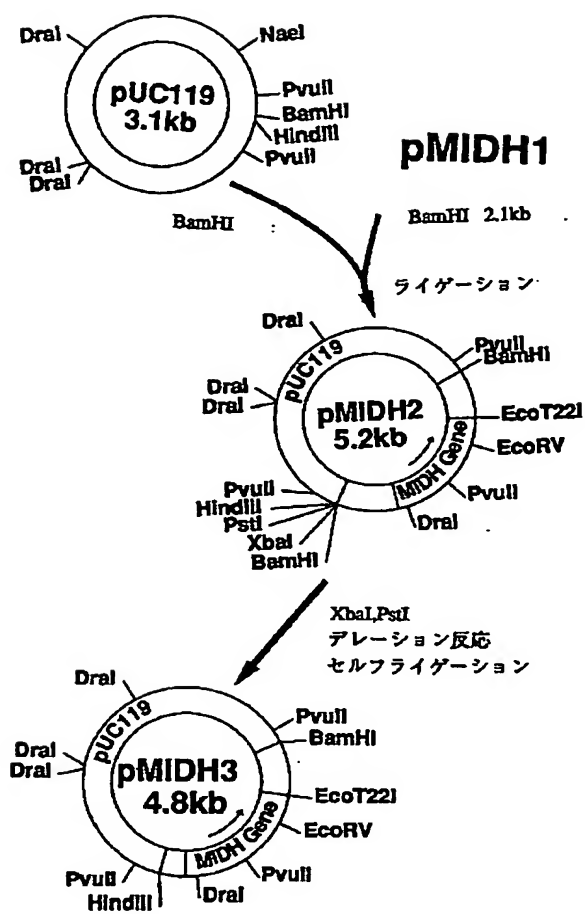
【図3】



【図8】



【図 9】



## 【図6】

## N-terminal

Met-Ser-Leu-Val-Lys-Val-Gly-Ile-Leu-Gly-Ala-Gly-Gly-Ile-Ala-Lys-Val-  
 His-Thr-Ser-Ile-Leu-Lys-Lys-Asp-Gln-Arg-Val-Glu-Ile-Val-Gly-Val-Ala-  
 Asp-Ile-Ala-Lys-Asp-Arg-Ala-Val-Ala-Leu-Ala-Asn-Glu-Ala-Gly-Asn-Ala-  
 Lys-Ala-Val-Gln-Ser-Leu-Glu-

Asp-Leu-Phe-Glu-Leu-Gly-Val-Asp-Ala-Val-Tyr-Val-Thr-Thr-Pro-Asn-Thr-  
 Leu- X -Val-

Ala-Ala-Glu-Thr-Ser-Lys-Ala-Val-Tyr-Asn-Leu-Gly-Met-Asn-Arg-Arg-Tyr-  
 Ala-Ser-Val-Tyr-Lys-Lys-

Val-Lys-Glu-Arg-Ile-Ser-Ser-Gly-Glu-Val-Thr-Pro-Tyr-Leu-Ala-Asn-Ile-  
 Lys-Met-Asn-Arg-Gly-Glu-Leu-Leu-Asn-Pro-Ala-Trp-Thr-Ala-Asp-Pro-Lys-  
 Val-Thr-Gly-Gly-Phe-Leu-Tyr-Glu-Thr-Pro-Phe-His-Leu-Met-Asp-Met- X -  
 Arg-Tyr-Leu-Phe-Gly-Glu-Val-His-Thr-Val-Tyr-

Val-Met-Tyr-Ala-Pro-Gly-Leu-Lys-His-Pro-Ala-His-Ile-Ser-Asp-Phe-Tyr-  
 His-Leu-Ser-Ile-Glu-Glu-Lys-Trp-Gly-Tyr-Ala-Glu-Glu-Asp-Arg-Leu-Phe-  
 Ile-Asp-Ala-Ile-Ile-His-Gly-Thr-Lys-Pro-Pro-Val-Thr-Ala-Glu-Asp-Gly-  
 Tyr-Arg-Ser-Ile-His-Leu-Leu-Glu-Ser-Ile-Tyr-Glu-Ser-Ala-Lys-Thr-Gly-  
 Lys-Met-Ile-Asp-Phe-Arg-His-Thr-Ala-Pro-Ser-Gln

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	
(C 1 2 N 9/04		C 1 2 R 1:19)	
C 1 2 R 1:19)		C 1 2 N 15/00	Z N A A

(58) 調査した分野(Int. Cl. <sup>7</sup>, DB名)

C12N 1/21  
 C12N 9/04  
 C12N 15/09 ZNA  
 BIOSIS (DIALOG)  
 WPI (DIALOG)  
 GenBank/EMBL/DDBJ/G  
 eneSeq  
 SwissProt/PIR/GeneS  
 eq